

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Farmacia

Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica



TESI DI SPECIALIZZAZIONE

***Ruolo delle proteine disaccoppianti UCPs nel
controllo della produzione di specie reattive
dell'ossigeno nei mitocondri.***

RELATORE

Ch.mo Prof.

Antonio Lucacchini

CANDIDATA

Michela Altieri

Matr. 436174

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Indice

| | Pag. |
|--|------|
| Introduzione | |
| • I mitocondri | 3 |
| • Funzione dei mitocondri | 9 |
| • La fosforilazione ossidativa | 11 |
| • Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) | 14 |
| • Chimica dei ROS | 15 |
| • La catena respiratoria mitocondriale come fonte di ROS | 18 |
| • Lo stress ossidativo e i radicali liberi | 19 |
| Capitolo 1 | |
| • Le proteine disaccoppianti UCPs | 24 |
| Capitolo 2 | |
| • I ROS | 28 |
| • I mitocondri: la maggiore risorsa di ROS nella cellula | 32 |
| • Mantenimento dei livelli di ROS: il classico sistema difensivo antiossidante | 38 |
| Discussione | 44 |
| Conclusioni | 65 |
| Bibliografia | 67 |

INTRODUZIONE

I mitocondri

I mitocondri sono organelli intracellulari che possono presentare forme e dimensioni molto diverse, per lo più assumono una conformazione ovale. Normalmente misurano circa 2 μm di lunghezza, con un diametro di 0,5 μm . Generalmente sono distribuiti in modo uniforme nel citoplasma e il loro numero è piuttosto variabile, in relazione all'attività e alla richiesta energetica della cellula.

I mitocondri possono effettuare movimenti sia passivi, causati dalle correnti citoplasmatiche, sia attivi, grazie alla presenza di proteine contrattili. Possono quindi modificarsi in lunghezza, avvolgersi e spostarsi all'interno del citoplasma.

Il numero e la morfologia dei mitocondri sono controllati da precisi rapporti di fusione e fissione. Sono state descritte importanti alterazioni morfologiche durante le fasi avanzate di morte cellulare apoptotica, una frammentazione del network mitocondriale e un rimodellamento delle cristae. Le proteine che controllano la morfologia mitocondriale (ad

esempio Opa1 e Fis1 per quanto riguarda la fissione e Mfn 1&2 per quanto riguarda la fusione) sembrano partecipare ai processi apoptotici, mentre è stato dimostrato che proteine associate con la regolazione dell'apoptosi (ad esempio Bax/Bak, Bid e Bcl-2) alterano l'ultrastruttura mitocondriale.

Pionieristici studi di microscopia elettronica, effettuati da G. Palade e F. Sjöstrand, hanno rivelato che i mitocondri sono delimitati da un sistema di due membrane costituite ciascuna da un doppio strato lipidico: la membrana mitocondriale esterna e la membrana mitocondriale interna. Quest'ultima è molto più lunga e ripiegata rispetto alla membrana esterna e forma una serie di introflessioni verso la matrice, che danno origine alle creste mitocondriali, disposte perpendicolarmente rispetto all'asse longitudinale del mitocondrio.

Sono stati osservati importanti cambiamenti conformazionali nella membrana interna di mitocondri isolati, ad esempio: la matrice sembra contrarsi in uno stato "condensato" in relazione a cambiamenti osmotici o di stato metabolico, durante i quali la membrana interna si allontana da quella esterna ad eccezione di punti chiamati "siti di contatto" (contact sites). I mitocondri osservati *in situ* sono stati spesso trovati nella cosiddetta conformazione "ortodossa", caratterizzata da un ampio volume della matrice e dal sistema di membrane separato da piccoli spazi nelle

zone di giunzione.

Attualmente la tomografia elettronica (TEM) è la tecnica che fornisce la più alta risoluzione tridimensionale della struttura interna di un mitocondrio. A differenza delle tecniche che usano sottili sezioni di tessuto (50-80 nm) in serie, la tomografia utilizza sezioni abbastanza spesse (0.25-1.0 μm) da contenere una porzione rappresentativa del volume mitocondriale.

Le immagini tridimensionali ottenute mostrano chiaramente che le cristae non hanno una natura “aperta” come normalmente vengono rappresentate, piuttosto mostrano una estesa natura tubulare.

Ricostruzioni di mitocondri di fegato di ratto “ortodossi”, isolati e *in situ*, mostrano il sistema di cristae appiattito, con poche interconnessioni fra loro, oppure completamente tubulare. I segmenti tubulari delle cristae sono sottili (30-40 nm di diametro) e lunghi qualche centinaio di nanometri, anche nello stato morfologico parzialmente condensato.

La tomografia elettronica insieme con la microscopia elettronica a trasmissione ad elevata risoluzione (HRTEM) ha rivelato nuove informazioni sulla struttura delle membrane mitocondriali e ha fornito nuove evidenze di compartimentazione mitocondriale.

L'area di superficie topologicamente continua della membrana interna

viene ora divisa in due domini distinti le cui superfici sono contigue.

Un dominio, lo spazio periferico della membrana interna o membrana interna di confine (“inner boundary membrane”) è posto molto vicino alla membrana esterna, e con essa stabilisce stretti contatti (“regioni puntate”) in numerose posizioni. Il secondo dominio origina dal primo e forma le creste. Queste si estendono all’interno del mitocondrio formando strutture tubulari o lamellari e sono connesse tra loro e lo spazio intermembrana mediante piccole giunzioni tubulari (circa 28 nm di diametro) chiamate “crista junction”.

Sulla base dei risultati ottenuti mediante la tomografia elettronica è stato delineato un nuovo modello che sostituisce il modello a invaginazioni: il modello “crista junction”, dove le creste non sono più invaginazioni con ampie aperture sullo spazio intermembrana, ma sono compartimenti separati connessi tra loro e allo spazio intermembrana mediante strette aperture tubulari. La maggior parte delle creste hanno più giunzioni che possono essere disposte sullo stesso lato o su lati opposti del perimetro mitocondriale. quando la cresta si estende completamente attraverso la matrice.

Le nuove interpretazioni della struttura mitocondriale possono avere importanti implicazioni funzionali: si è ipotizzato che le “crista junctions”

possano rappresentare una barriera alla libera diffusione degli ioni dallo spazio tra le creste allo spazio intermembrana, nonché una barriera alla diffusione delle proteine che verrebbero distribuite diversamente tra i due domini della membrana interna consentendo la compartimentazione delle sue funzioni.

La composizione dei quattro compartimenti principali è in gran parte nota:

- **La membrana esterna** è liscia e piuttosto elastica, è costituita per circa il 30-40% da lipidi e per il restante 60% da proteine. In particolare sono presenti concentrazioni relativamente elevate di una proteina chiamata porina o canale anione selettivo voltaggio-dipendente (VDAC). Questa proteina, polimerizzando e formando pori (canali acquosi transmembrana), rende la membrana esterna liberamente permeabile agli ioni e alle molecole con peso molecolare inferiore a 5000 Dalton. Tale permeabilità è confermata dal fatto che la composizione biochimica dello spazio intermembrana è simile a quella del citoplasma. La restante composizione proteica è costituita da un gruppo eterogeneo di componenti comprendenti vari enzimi coinvolti nel metabolismo dei fosfolipidi.

La membrana interna è particolarmente ricca in proteine, che rappresentano circa l'80% del peso, e relativamente povera di lipidi (20%). E' impermeabile a quasi tutti gli anioni, i cationi e in particolare ai protoni

.Questa caratteristica consente la formazione di gradienti transmembrana necessari alla funzione mitocondriale. La scarsa permeabilità è dovuta all'assenza di porina e all'elevato contenuto di un particolare fosfolipide: la cardiolipina (difosfatidilglicerolo). La cardiolipina modula l'attività di molti enzimi della catena respiratoria. Nella membrana interna sono situati: gli enzimi della catena di trasporto degli elettroni, l'enzima ATP sintasi ed alcune proteine di trasporto per le molecole che vengono metabolizzate dagli enzimi presenti nella matrice mitocondriale .

Lo spazio intermembrana è caratterizzato dalla presenza di un enzima specifico, la miochinasi, che catalizza la fosforilazione dell'adenosina 5'-monofosfato (AMP) ad adenosina 5'-difosfato (ADP). Sono inoltre presenti le proteine proapoptotiche.

La matrice è una fase simile a un gel costituita per il 50% da proteine, è omogenea o finemente granulare, ma in alcuni casi può presentare granuli densi e materiale filamentoso.

I granuli della matrice sono stati isolati e si ritiene che siano deputati a legare cationi bivalenti, particolarmente Mg^{+2} e Ca^{+2} .

E' noto infatti che i mitocondri rappresentano uno dei depositi di ioni calcio più importanti all'interno della cellula. La matrice contiene numerose proteine, tra cui gli enzimi del ciclo di Krebs, quelli della β -ossidazione

degli acidi grassi e del metabolismo degli amminoacidi. I mitocondri sono caratterizzati dal fatto di possedere un DNA circolare proprio relativamente piccolo (16569 paia di basi nell'uomo), compatto e privo di introni, che codifica gli RNA ribosomiali, i tRNA necessari per tradurre tutti i codoni e 13 proteine dei complessi della catena respiratoria. Le restanti proteine che compongono i cinque complessi implicati nella fosforilazione ossidativa sono codificate dal DNA nucleare, implicando una stretta complementazione tra i due sistemi genetici.

La funzione dei mitocondri

Il mitocondrio ha un ruolo centrale nella sopravvivenza delle cellule eucariotiche, attraverso la fosforilazione ossidativa, la β -ossidazione degli acidi grassi e il ciclo di Krebs, ma ha un ruolo altrettanto importante nella regolazione della morte cellulare attraverso l'apoptosi.

I mitocondri furono identificati nel 1949 come il sito del metabolismo energetico ossidativo, generando gran parte dell'energia nelle cellule eucariotiche attraverso la fosforilazione ossidativa.

Durante questo processo il NADH o il FADH₂, generati dall'ossidazione

degli acidi grassi e dal ciclo di Krebs, vengono utilizzati come donatori di elettroni.

Gli elettroni ricavati dall'ossidazione del NADH, che presenta un potenziale di riduzione di - 0,32 V sono trasferiti all'ossigeno molecolare (O_2), che ha un potenziale di riduzione positivo del valore di 0.82 V. Il trasferimento elettronico è catalizzato da una serie di complessi enzimatici presenti nella membrana interna che costituiscono la catena respiratoria.

Il flusso di elettroni da NADH a ossigeno molecolare è un processo esoergonico la cui variazione di energia libera ($-52,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) è utilizzata dai complessi I, III e IV per pompare protoni attraverso la membrana mitocondriale interna, dalla matrice al versante citosolico.

La concentrazione di H^+ , più bassa nella matrice rispetto allo spazio transmembrana, genera un gradiente di pH (ΔpH) e un gradiente di potenziale elettrico transmembrana ($\Delta \Psi$), che in condizioni fisiologiche assume valori tra - 150 e - 200 mV.

Secondo l'ipotesi chemiosmotica di Mitchell, questa forza motrice protonica è utilizzata dall'ATP sintasi, che catalizza la produzione di ATP a partire da ADP e P_i , con un processo endoergonico la cui variazione di energia libera è pari a $7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

La fosforilazione ossidativa

Il sistema della fosforilazione ossidativa è inglobato nel doppio strato lipidico della membrana interna mitocondriale, e comprende la **catena di trasporto elettronico** e l'**ATP sintasi**. La funzione principale del sistema è il trasporto coordinato di elettroni e di protoni che porta alla produzione di ATP a partire da ADP e da fosfato inorganico.

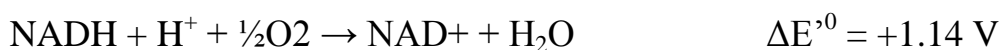
La **catena respiratoria** è formata da quattro complessi enzimatici multiproteici (Complessi I, II, III, IV) che presentano diversi gruppi prostetici, e da due trasportatori mobili di elettroni : il Coenzima Q (CoQ) e il citocromo c. L'organizzazione della catena respiratoria è ancora oggetto di studio. Esistono due modelli che descrivono come potrebbero essere distribuiti i complessi nello strato lipidico: 1) Random collision model, secondo cui i complessi sono distribuiti in maniera casuale nel doppio strato lipidico; 2) Il Respirosoma, secondo il quale i complessi non sono totalmente indipendenti l'uno dall'altro, ma formano Supercomplessi, cioè aggregati stabili che contengono i complessi I, III, IV in diversi rapporti stechiometrici.

La fosforilazione ossidativa ha inizio con l'ingresso degli elettroni nella catena respiratoria. Diversi substrati (tra cui glutammato, malato, piruvato,

gliceraldeide 3-fosfato, succinato) sono metabolizzati nel citosol o nella matrice mitocondriale producendo equivalenti riducenti che entrano nella catena respiratoria in punti separati. Equivalenti riducenti come il NADH (nicotinammide adenin dinucleotide ridotta) e il FADH₂ (flavina adenin dinucleotide ridotta), vengono ossidati rispettivamente a livello dei complessi I e II: gli elettroni vengono così trasferiti attraverso i diversi compartimenti della catena secondo una sequenza specifica, guidata dai potenziali di ossido-riduzione di ciascuna specie redox.

Gli elettroni vengono trasferiti dai centri con potenziale negativo verso quelli a potenziale positivo (rendendo così il trasporto degli elettroni lungo la catena un processo esoergonico) fino all'accettore elettronico finale, l'ossigeno molecolare, che viene ridotto ad acqua.

Nel caso dell'ossidazione del NADH, la reazione complessiva catalizzata dalla catena respiratoria è :



e la variazione corrispondente di energia libera standard è:

$$\Delta G'^0 = -n \cdot F \cdot \Delta E'^0 = -220 \text{ kJ/mole}$$

dove :

n= numero di elettroni trasferiti; F= costante di Faraday= 96.5 KJ·V⁻¹·mol⁻¹; ΔE'⁰= differenza di potenziale standard a pH=7.

Nel caso dell'ossidazione di substrati flavinici (FADH_2), la differenza di potenziale redox è di 0.72V, che corrisponde a $\Delta G'^0 = -139\text{kJ/mol}$.

Due elettroni per ogni NADH ossidato dal Complesso I sono trasferiti al trasportatore mobile di elettroni ubiquinone, che si riduce a chinolo.

Analogamente il Complesso II, catalizzando l'ossidazione del succinato a fumarato, ed altri enzimi, come l'alfa-glicerofosfato deidrogenasi, riducono l'ubichinone a chinolo.

Il complesso III catalizza l'ossidazione del chinolo a chinone, trasferendo gli elettroni ottenuti in questo processo al citocromo c, il secondo trasportatore mobile di elettroni presente nella catena respiratoria. Il citocromo c ridotto viene poi ossidato a livello del complesso IV, che trasferisce gli elettroni all'ossigeno molecolare riducendolo ad acqua.

L'energia libera resa disponibile dal flusso di elettroni è accoppiata al trasporto endoergonico di protoni nello spazio intermembrana da parte dei complessi I, III e IV attraverso la membrana mitocondriale interna.

Tale trasporto protonico produce sia un gradiente chimico (ΔpH) sia un gradiente elettrico ($\Delta\Psi$). Si genera così una forza elettromotrice protonica che spinge i protoni dallo spazio intermembrana verso la matrice. Poiché la membrana interna è impermeabile ai protoni questi per rientrare devono attraversare il canale transmembrana specifico del settore F_0 della ATP

sintasi (o complesso V). La forza motrice che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia necessaria alla sintesi di ATP, catalizzata dal settore F_1 della ATP sintasi. Parte dell'ATP è utilizzata per i bisogni propri del mitocondrio, la maggior parte è trasportata fuori dall'organello mediante il traslocatore adenin-nucleotidico (ANT) ed è usata per le diverse funzioni cellulari.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

L'ossigeno è una molecola dotata di un grande potere ossidante, per questo motivo accetta con facilità elettroni da altre molecole, dando origine a prodotti di riduzione parziale, noti come specie reattive dell'ossigeno (**Reactive Oxygen Species**).

I ROS sono dotati di una grande reattività e aspecificità che li porta ad aggredire in modo indiscriminato svariate molecole organiche: acidi grassi delle membrane biologiche, proteine, carboidrati e DNA, causando spesso danni irreversibili per le cellule.

I radicali liberi sono atomi o molecole che possiedono uno o più elettroni spaiati. Queste specie spesso instabili tendono ad appaiare tali elettroni, cedendo o ricevendo un elettrone di spin opposto da altri composti per

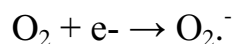
raggiungere un assetto stabile. Possono quindi reagire con altri radicali ma anche con molecole organiche non radicaliche, sia come agenti ossidanti che riducenti, generando un sistema di reazioni a catena dannose per i sistemi biologici.

E' paradossale, dunque, come la prima risorsa energetica dell'organismo aerobio, l'O₂, sia causa, tramite le specie reattive da esso derivate, di alterazioni cellulari che possono essere causa di invecchiamento e di morte cellulare.

Le specie reattive dell'ossigeno sono sia molecole neutre come l'acqua ossigenata, H₂O₂, sia molecole a carattere radicalico come il radicale superossido, O₂⁻, il radicale ossidrile, OH⁻ e l'ossido di azoto radicale NO⁻.

Chimica dei ROS

Anione superossido (O₂⁻) : è una specie precursore di molte altre ROS; è fisiologicamente prodotto nel nostro organismo in seguito alla riduzione monoelettronica dell'ossigeno molecolare.



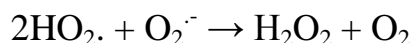
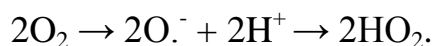
Due molecole di superossido possono dismutare spontaneamente dando origine ad una molecola di perossido d'idrogeno:



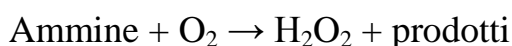
Questa reazione può essere catalizzata da un'enzima intracellulare, la superossido dismutasi (SOD):



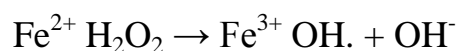
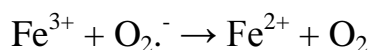
Perossido di idrogeno (H_2O_2) : si genera dalla dismutazione del radicale superossido e dalla protonazione del radicale diossido di idrogeno (HO_2^{\cdot}) che reagisce a sua volta con un'altra molecola di superossido per dare perossido di idrogeno:



Un'altra reazione di formazione di H_2O_2 nella cellula , avviene tramite l'azione di ossidasi tra cui l'enzima monoaminoossidasi (MAO) :



Il perossido di idrogeno è una molecola relativamente poco reattiva. In presenza del radicale superossido e di cationi metallici, come ferro e rame, genera il radicale ossidrile; questa reazione è nota come reazione di Fenton:



Nel corso di processi infiammatori e necrotici, avviene spesso il rilascio di metalli, che normalmente non provocano danni in quanto sono complessati

a molti enzimi (es. superossido dismutasi , glutazione perossidasi , xantina ossidasi e NADPH ossidasi) e a proteine come l'emoglobina e la mioglobina. Questo evento rappresenta un fattore determinante per la produzione del radicale ossidrile che, a sua volta, provoca l'amplificazione del danno strutturale dei tessuti.

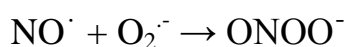
Radicale ossidrile (OH^\bullet) : reagisce molto rapidamente con qualunque molecola si trovi nelle sue vicinanze, causando danni ossidativi a proteine, lipidi e DNA.

Monossido di azoto (NO^\bullet) : è sintetizzato dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) e agisce come messaggero intracellulare associato con vari eventi fisiologici e patologici.

Recenti studi hanno rivelato che l' NO . inibisce l'attività della caspasi-3, un enzima cruciale per l'apoptosi, e quindi protegge le cellule nervose dal processo di morte programmata.

Kawahara e altri hanno riscontrato una differenza nella resistenza alla citotossicità indotta dall' NO . tra cellule NG108-15 (cellule ibride di Neuroblastoma-Glioma) indifferenziate e differenziate. Questo studio dimostra che le cellule differenziate diventano marcatamente resistenti alla tossicità indotta da NO .. Questo incremento di resistenza è correlato con

l'attività della SOD, ma non con l'attività della NOS. Questi risultati sostengono la tesi di Lei et al. Questi autori pensano che l' NO^\cdot sia necessario ma non sufficiente al danno neuronale e che sia tossico solo in presenza di altri fattori, come l'anione superossido. Il monossido di azoto può reagire con il superossido dando origine al perossinitrito, una specie non radicalica ma molto reattiva nei confronti di molte biomolecole



La catena respiratoria mitocondriale come fonte di ROS

La catena respiratoria mitocondriale rappresenta la principale sorgente di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule, in particolare del radicale superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). L'importanza assunta dai mitocondri nella produzione di ROS è indirettamente evidenziata dagli effetti della carenza di enzimi mitocondriali antiossidanti, quali la superossido dismutasi (SOD-2) e la glutazione perossidasi (GPx). La mancanza di SOD-2 e di GPx mitocondriale è considerata deleteria per le cellule.

Il radicale superossido si genera quando una piccola frazione del flusso elettronico, proveniente da substrati quali NADH e FADH_2 , sfugge ai complessi della catena respiratoria e riduce in maniera univalente una

molecola di ossigeno. E' stato calcolato che circa l'1-5% dell'ossigeno presente nei mitocondri può essere ridotto direttamente da elettroni che sfuggono alla catena respiratoria a monte del Complesso IV, quali il Complesso I e il Complesso III, generando superossido.

Lo Stress Ossidativo e i radicali liberi

È stato proposto che l'invecchiamento potrebbe essere causato dall'accumulo di effetti deleteri delle specie reattive dell'ossigeno (Harman, 1981). È alquanto paradossale che l'ossigeno, l'elemento essenziale per la vita, possa anche essere dannoso per l'organismo e questo fenomeno è conosciuto come "il paradosso dell'ossigeno". L'addizione di un singolo elettrone alla molecola di ossigeno, attraverso dei processi di riduzione, conduce alla formazione sequenziale di una serie di molecole reattive come O^{2-} , H_2O_2 e OH^- , che sono i principali ROS generati nel muscolo (Reid, 2001). La catena respiratoria è essa stessa una fonte importante di ROS. Circa il 2-3% dell'ossigeno reattivo sembra essere ossidato a radicale superossido, O^{2-} .

Tra gli elementi reattivi, il radicale idrossido OH , sembra essere nocivo per la produzione di danni ossidativi alle altre componenti molecolari che sono

presenti nella cellula: perossidazione dei fosfolipidi di membrana, modificazione del DNA nucleare, o alterazioni delle proteine, causate da cambiamenti enzimatici e proteolisi. Il danno indotto dai ROS ai differenti componenti cellulari è conosciuto, nell'insieme, come “stress ossidativo”.

Una presentazione grafica semplificata del bilancio ideale è il “ triangolo d'oro ” i cui componenti sono: ossidanti, antiossidanti e biomolecole, ciascuno dei quali è rappresentato ad un apice nella Fig. 2.

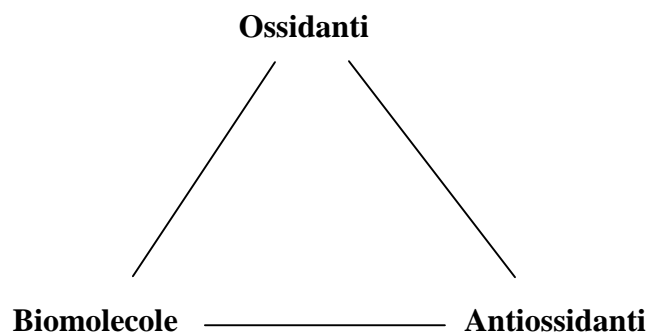


Fig.2. Il “ triangolo d'oro ” del bilancio ossidativo.

In una situazione normale, esiste un equilibrio bilanciato tra i tre elementi del triangolo. I processi patogenici risulteranno da qualsiasi turbamento di questo equilibrio ciascuno causato da una diminuzione nel livello degli antiossidanti, o da un eccesso di elementi ossidanti. Una qualunque di queste condizioni causerà stress ossidativi, provocando un danno nella cellula e all'intero tessuto.

Le proteine, durante il processo ossidativo, sembrano essere inclini a diverse vie: (a) ossidazione dello scheletro della proteina, con frammentazione della proteina stessa, (b) formazione di legami incrociati proteina-proteina, (c) ossidazione di amminoacidi delle catene laterali, (d) la formazione di derivati carbonilici.

La lista degli agenti contenenti carbonile include le aldeidi reattive (RA), come, per esempio, quelle contenute nelle sigarette, i prodotti della perossidazione dei lipidi, come il 4-idrossi-2-nonenale e la malondialdeide (MDA), o le sostanze prodotte dalla riduzione degli zuccheri, o quei prodotti di ossidazione con residui di lisina.

Un'ulteriore fonte per i derivati carbonilici delle proteine è quella dell'ossidazione catalizzata dai metalli, attraverso una reazione di Fenton, catalizzata da un metallo, dei gruppi amminici delle catene laterali. Durante l'invecchiamento, la produzione di ROS sembra incrementare, come risultato della funzione insufficiente funzionalità della catena respiratoria, e forse come risultato dovuto a delle mutazioni dell'mtDNA. I sistemi di difesa cellulare, enzimatici e non enzimatici, antiossidanti, includono la glutazione perossidasi, la superossido dismutasi, le catalasi, le vitamine A, C, E e altri elementi. Il grado di ossidazione delle proteine, misurato come contenuto di carbonile, e di perossidazione lipidica, valutato

attraverso la formazione delle aldeidi, sono i criteri più frequentemente usati nel determinare il danno ossidativo nel muscolo.

Diversi studi hanno dimostrato che la perossidazione dei lipidi (non stimolata e ferro-stimolata enzimaticamente) diminuisce fortemente nel muscolo scheletrico di topi NMR-1 invecchiati (Salminen et al., 1988).

L'ossidazione delle proteine, ad opera di radicali idrossilici e specie reattive di azoto, è stata misurata in diversi tessuti di ratti anziani (Leeuwenburgh et al., 1998). Né la o-tirosina, né la 3-nitrotirosina aumentano significativamente con l'età, in quei tessuti in cui, tali sostanze, sono state misurate, suggerendo che ROS e RNS non si accumulano con l'avanzare dell'età. Le attività di diversi enzimi antiossidanti come total-SOD e MnSOD, GSHPx e le catalasi, nei muscoli di individui anziani, non mostrano incrementi, fatta eccezione per MnSOD (Pansarasa et al., 1999).

Comunque, in persone di età superiore ai 65 anni, si ha un aumento della glutatione ossidasi (GSSG) e della perossidazione dei lipidi.

Questi dati indicano che sopra i 65 anni d'età, il danno ROS dipendente diventa cruciale e comincia ad apparire. Il funzionamento di isoforme neuronali della nitrossido sintetasi (NOS) è ridotto nei muscoli di individui anziani, rispetto a quelli giovani, e, contemporaneamente, si ha una diminuzione della perossidazione dei lipidi nel muscolo *Extensor*

digitorum longus (EDL), ma non nel muscolo *Soleus*. Questi risultati indicano che la produzione di NO, che è importante per il metabolismo del muscolo, sembra essere importante anche nei muscoli invecchiati (Richmonds et al., 1999).

È stata riportata una valutazione del livello dei carbonili, come misura dell'ossidazione delle proteine, nei muscoli invecchiati di ratto (Reznick and Packer, 1994). È stato trovato che i gruppi carbonili delle proteine, nel muscolo Gastrocnemius di ratti anziani, comparato con quelli di ratti giovani, sono aumentati approssimativamente del 50%.

Riassumendo, molti studi, che si basano sulla determinazione di vari parametri di ossidazione, hanno dimostrato significativi incrementi del danno ossidativo nei muscoli durante l'invecchiamento.

Capitolo 1

Le proteine disaccoppianti UCPs

Le proteine disaccoppianti (UCPs) appartengono ad una famiglia di trasportatori anionici situati nella membrana interna dei mitocondri e sono responsabili del disaccoppiamento dell'ossidazione del substrato dalla sintesi dell'ATP.

Di conseguenza, l'energia accumulata viene rilasciata come calore.

Fino ad oggi, nei mammiferi sono stati identificati cinque proteine disaccoppianti omologhe, da UCP1 a UCP5.

L'UCP1 (4q28.31), il primo membro della famiglia caratterizzato, è espressa principalmente nel tessuto adiposo bruno (BAT), dove ha un ruolo consolidato quando questo è esposto al freddo e nella termogenesi indotta dalla dieta.

UCP2 e UCP3 condividono una regione comune sul cromosoma 11q13.

UCP2 è largamente espressa in molti organi e tessuti, mentre UCP3 è principalmente espressa nel muscolo scheletrico, muscolo cardiaco, e nel tessuto adiposo bruno (BAT).

Infine, UCP4 e UCP5 sono principalmente espresse nel sistema nervoso centrale e, in maniera inferiore, anche in altri tessuti.

Diversamente da UCP1, il fisiologico ruolo delle altre UCPs non è ancora del tutto noto.

È stato ipotizzato che tali proteine possano fornire protezione dal danno ossidativo, impedendo un' eccessiva produzione specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte dei mitocondri.

Infatti, topi knockout per UCP hanno i livelli aumentati di ROS e mostrano segni di una maggiore danno ossidativo.

Ulteriori evidenze indicano che l'attivazione di UCP2 e UCP3 da ROS porta ad un lieve disaccoppiamento e alla diminuita formazione di ROS, mentre la loro inibizione da nucleotidi purinici aumenta il potenziale di membrana e la produzione mitocondriale di ROS.

L'attività di disaccoppiamento delle UCPs è stata anche legata alla regolazione di altre funzioni metaboliche più specifiche come l' ossidazione degli acidi grassi, la secrezione di insulina stimolata dal glucosio, tutto il bilancio energetico del corpo, e l'apoptosi.

Nell'uomo il processo di invecchiamento è caratterizzato da una progressiva riduzione della capacità di coordinare il consumo di energia cellulare e il suo stoccaggio (funzione cruciale per mantenere l'omeostasi

dell' energia), e da una graduale diminuzione dell'abilità di fornire una risposta positiva allo stress.

Questi cambiamenti fisiologici sono in genere associati a modificazioni nella composizione corporea (come ad esempio un aumento della massa grassa e il declino della massa magra), e ad uno stato cronico di stress ossidativo con importanti conseguenze sullo stato di salute.

La funzione mitocondriale è cruciale in questi processi, essendo essi i principali siti cellulari di controllo del metabolismo energetico e dello stato redox.

Così, promuovendo l' ossidazione degli acidi grassi, e riducendo la produzione di ATP e di ROS, l'induzione al disaccoppiamento mitocondriale mediante UCPs può anche essere un percorso critico nella modulazione del tasso e della durata dell' invecchiamento.

Questa teoria, proposta per primo da M. D. Brand e definita come " disaccoppiamento per la sopravvivenza", è ora supportata da diverse evidenze sperimentali.

È interessante vedere che l' espressione mirata dell' UCP esogena allunga la durata della vita delle mosche adulte, mentre i topi con elevato metabolismo vivono più a lungo e hanno una maggiore attività di disaccoppiamento.

I topi transgenici e knockout per i geni UCP mostrano alterazioni nel ciclo della vita.

È stato anche dimostrato che in vivo il disaccoppiamento imita gli effetti metabolici e la durata della restrizione calorica.

Coerentemente, i topi sottoposti a restrizione calorica mostrano un' aumentata espressione di UCP2 e UCP3.

Negli esseri umani la correlazione tra il disaccoppiamento mitocondriale e l' invecchiamento emerge da studi che supportano il ruolo per le UCPs in molti tratti fenotipici legati all'età che coinvolgono alterazioni nell' omeostasi dell' energia cellulare, quali obesità, il diabete e le malattie correlate ai lipidi.

Data l'espressione tessuto-specifica dei geni UCP, sembra probabile che possano influenzare la senescenza di diversi tessuti con importanti effetti sul processo globale di invecchiamento e di conseguenza sulla durata della vita.

CAPITOLO 2

I ROS

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno delle cellule aerobiche svolgono un duplice ruolo, servendo sia come molecole di segnalazione, in una vasta gamma di normali processi cellulari, sia come agenti ossidanti potenzialmente in grado di innescare la morte cellulare.

Per sfruttare la capacità di segnalazione dei ROS, senza soccombere ai loro effetti tossici, le cellule aerobiche hanno sviluppato elaborate strategie per mantenere questi trasportatori di singoli elettroni entro limiti tollerabili.

L'arsenale antiossidante è costituito da un'ampia serie di enzimi e da complessi a basso peso molecolare che sequestrano le molecole di ROS generate in eccesso dalla respirazione aerobica.

Così, le cellule intraprendono una complessa serie di misure preventive acute e croniche.

Alcuni sistemi antiossidanti possono essere energeticamente “costosi” perchè dipendono sia dall'ATP, sia dal NADPH. Per questo fine, il “blando” disaccoppiamento del sistema della fosforilazione ossidativa rappresenta un

meccanismo ingegnoso ed energeticamente costoso per diminuire la produzione di ROS.

Il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa rappresenta un “corto circuito” del sistema dovuto alla perdita di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice.

Questo significa che i protoni by-passano la sintesi dell'ATP e causano una diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale interna.

Infatti, la respirazione mitocondriale è la principale fonte di ROS nelle cellule aerobiche.

Si pensa che l'elevata anormale produzione di ROS possa essere alla base di diverse patologie associate a malattie neurologiche degenerative (per esempio Alzheimer e Parkinson), all'obesità, al diabete di tipo 1 e 2, alla sindrome metabolica, a malattie cardiovascolari e all'invecchiamento.

È ben noto che esiste una forte correlazione tra il potenziale di membrana mitocondriale e la produzione di ROS.

Un piccolo incremento del potenziale di membrana induce la formazione di ROS, mentre una sua leggera diminuzione può notevolmente ridurre la produzione di questi intermedi reattivi.

Questo rapporto non-ohmico tra la produzione di ROS e il potenziale di membrana indica che anche una piccola diminuzione del potenziale di

membrana potrebbe ridurre la produzione di ROS senza abbassare notevolmente l'efficienza della fosforilazione ossidativa.

Quindi, il piccolo disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale può rappresentare la prima linea di difesa contro lo stress ossidativo.

Il "disaccoppiamento per sopravvivere" postula l'ipotesi che una porzione del gradiente protonico mitocondriale usato per guidare la sintesi di ATP è "trapelata" indietro nella matrice mitocondriale per diminuire ROS emissione.

Durante la respirazione basale, il disaccoppiamento rappresenta il 20-50% del consumo di energia consumata da parte mitocondri di una cellula normalmente funzionante.

A prima vista, questo ciclo "futile" di pompaggio del protone e la fuoriuscita attraverso la membrana interna può sembrare uno spreco perché l'energia utilizzata per pompare i protoni fuori dalla matrice e accumulata nel gradiente protonico è semplicemente persa come calore.

Tuttavia, si ritiene che questo processo sia biochimicamente significativo perché può indurre a mantenere i livelli di ROS sotto controllo mantenendo la membrana mitocondriale interna meno polarizzata.

Inoltre, si pensa che la perdita respirazione-dipendente permetta alle cellule

(ad.esempio quelle muscolari) di disattivarla rapidamente, in modo da avere un' elevata efficienza di produzione di ATP che non richiede enormi aumenti della domanda di ossigeno.

In altre parole, quando la domanda di ATP aumenta, i protoni tornano attraverso la ATP sintasi piuttosto che fuoriuscire nella matrice.

Sebbene i meccanismi responsabili della perdita protonica mitocondriale siano ancora discussi, le proteine ritenute coinvolte sono la nucleotide adenina translocasi (ANT) e le proteine disaccoppianti, UCPs 1-3.

Il ruolo di ANT a questo proposito rimane controverso.

Come descritto in ulteriore dettaglio di seguito, ROS e i derivati di ROS (in particolare il superossido 4-idrossi-2-nonenale) sono stati descritti come attivatori di UCPs 1-3.

Pertanto, è stato ipotizzato un meccanismo a feedback negativo secondo il quale si ha un incremento del disaccoppiamento, indotto da ROS, per diminuire la formazione di queste specie tossiche.

Tuttavia, nonostante questa osservazione abbiamo ancora una scarsa comprensione dei meccanismi molecolari.

I mitocondri: la maggiore risorsa di ROS nella cellula

I mitocondri sono meglio conosciuti per il loro ruolo nella sintesi di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa, tuttavia, partecipano chiaramente a numerose altri processi cellulari tra i quali l'omeostasi del calcio e l'apoptosi.

I mitocondri sono responsabili del mantenimento delle notevoli concentrazioni cellulari stabili di ATP nonostante la richiesta di quest'ultima cambi molto spesso (la fosfocreatina contribuisce anche in piccola misura in alcuni tessuti come i muscoli).

La produzione di ATP mitocondriale è alimentata dall'energia chimica immagazzinata nei legami carbonio-carbonio di vari substrati energetici e si basa sul grande potere ossidativo dell'ossigeno biatomico (O_2).

Dopo l'ossidazione dei substrati nel ciclo degli acidi tricarbossilici, i trasportatori degli elettroni risultanti, NADH e $FADH_2$, vengono ossidati, rispettivamente, dai complessi I e II.

Gli elettroni liberati da equivalenti riducenti vengono quindi trasferiti attraverso i complessi III e IV della catena respiratoria tramite i gruppi prostetici disposti in modo da aumentare il potenziale redox dell'accettore di terminale degli elettroni, ovvero l' O_2 .

La variazione favorevole di energia libera derivante dal trasferimento degli elettroni all' O_2 è accoppiata al trasporto di protoni, da parte dei complessi I, III, e IV, dalla matrice nello spazio intermembrana.

Questo genera una forza motrice protonica (Δp) composta da un gradiente elettrico ($\Delta \psi_m$) e da un gradiente chimico (ΔpH) attraverso la membrana mitocondriale interna.

Nella maggior parte delle condizioni metaboliche $\Delta \psi_m$ è responsabile, approssimativamente, di circa l' 80-85% di Δp e perché sia più facilmente misurabile, in vari sistemi cellulari, i due termini vengono spesso utilizzati in modo improprio come sinonimi.

Indipendentemente da ciò, il potenziale di energia immagazzinata viene quindi sfruttato dall' F_0F_1 ATP sintasi come protoni per muoversi nuovamente attraverso la matrice e guidare la formazione di ATP a partire da ADP e P_i .

Questo processo viene definito respirazione accoppiata in quanto l' energia derivata dal trasferimento degli elettroni all' accettore terminale degli elettroni terminale O_2 è completamente sfruttata per guidare la produzione di ATP.

Tuttavia, la riduzione dell' O_2 ad acqua durante la respirazione aerobica è accompagnata da estensioni variabili di formazione dell' intermedio

reattivo, a causa della struttura atomica di O_2 e della disponibilità degli elettroni nella catena respiratoria.

Infatti, O_2 può accettare solo un elettrone alla volta da un donatore di elettroni perché i due elettroni più esterni in presenza di ossigeno molecolare occupano orbitali separati.

Di conseguenza, la riduzione univalente dell' O_2 porta come risultato alla formazione di vari intermedi contenenti un singolo elettrone che possono danneggiare la cella.

È interessante notare che la riduzione di un singolo elettrone dell' O_2 a H_2O nei mitocondri avviene nel complesso IV, ma questo componente della catena respiratoria non produce ROS.

Ci sono altri siti di emissione di ROS nei mitocondri, al di là la catena di trasporto degli elettroni.

Questi includono l' α -chetoglutarato deidrogenasi, il glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (FAD dipendente), presente esclusivamente nel tessuto adiposo bruno e in misura minore nel fegato e negli isolotti pancreatici, il diidroorotato deidrogenasi, e la flavoproteina che trasferisce elettroni: ubiquinone ossidoreduttasi.

Tuttavia, si pensa generalmente che i due siti principali di produzione mitocondriale di ROS siano i complessi I e III della catena respiratoria.

In particolare, il complesso I genera i superossidi sul lato della matrice, che il complesso III produce i superossidi sia nello spazio intermembrana sia sul lato della matrice della membrana mitocondriale.

NADH: ubiquinone ossido-reduttasi (complesso I) è composta da circa 45 subunità e è il sito di ossidazione del NADH.

Il Flavin mononucleotide (FMN) del complesso I accetta gli elettroni dal NADH e li trasferisce attraverso una serie di otto clusters ferro-zolfo all'ubichinone.

Il Complesso I genera il superossido in presenza di NADH e questo è aumentato dal rotenone un inibitore del sito di legame dell'ubichinone, indicando che il flavin mononucleotide è responsabile della produzione di ROS.

La produzione di ROS da parte del complesso I è anche proporzionale alla quantità di NADH disponibile e all'efficienza della sua ossidazione.

Il Complesso I genera ROS anche dopo l'ossidazione del succinato al complesso II mediante un processo che fa ricorso al trasporto inverso degli elettroni (RET).

Si è inoltre ipotizzato che la produzione di ROS da parte del complesso I durante il trasporto inverso degli elettroni avviene dal flavin mononucleotide.

Questo si basa su prove che indicano che i ROS prodotti dai mitocondri isolati durante la respirazione del succinato può essere inibita mediante il rotenone o il difenilene iodonio, inibitore delle flavoproteine.

Queste osservazioni indicano inoltre che la flavin mononucleotide nel complesso I è l' importante luogo di formazione di superossido.

Non è noto se il trasporto inverso degli elettroni che induce la produzione di ROS è di importanza fisiologica perché in vitro è necessaria una quantità millimolare di succinato (la concentrazione cellulare di succinato è nel campo dei micromolare) per guidare questo processo.

In alternativa, è stato dimostrato che il sito dell' ubiquinone può mostrare un alto tasso di produzione di ROS, che è dipende da un elevato gradiente di pH e dalla presenza di inibitori specifici del sito di legame del chinone.

Tuttavia, utilizzando il complesso I purificato, Galkin e Brandt hanno riportato che, effettivamente, ad un pH elevato è favorito un aumento della formazione di ROS dal flavin mononucle, nonostante l' aggiunta di chinoni alla miscela di reazione.

Generalmente si pensava che nessuna produzione di superossido avveniva dai clusters Fe-S perché questi gruppi prostetici sono ben protetti da O₂.

L' ubiquinol-citocromo c ossidoreduttasi (complesso III) ha 11 subunità e contiene 3 gruppi eme e un centro Fe-S, chiamato centro di Rieske.

Il complesso III svolge un ruolo complesso nel passaggio degli elettroni dall'ubichinolo, generato dai complessi I e II, al citocromo c.

L'ubichinone dopo essersi legato al sito Q_o , cede un elettrone al centro Fe-S, da qui l'elettrone viene trasferito al citocromo c_1 e, quindi, al citocromo c.

Il risultante semichinone instabile dona poi l'elettrone rimanente al gruppo eme del citocromo b (citocromo b_L e b_H).

L'elettrone nel citocromo b viene poi utilizzato per ridurre nuovamente l'ubichinone nel sito di Q_i producendo ubichinolo.

Dai semichinoni al sito Q_o sono richiesti due elettroni per la riduzione dell'ubichinone ad ubichinolo nel sito Q_i .

Questo processo è denominato “Q-cycle” perché gli elettroni solitari perché gli elettroni rimanenti nel semichinone vengono riutilizzati per ridurre l'ubichinone dietro l'ubichinolo.

Ancora più importante, questo meccanismo ciclico dell'elettrone è fondamentale per prevenire l'uso di questi elettroni soli per la riduzione monovalente di O_2 a ROS.

Nonostante l'efficienza del riciclo degli elettroni nel “Q-cycle”, questo non esime il complesso III dalla produzione di ROS.

In realtà, il complesso III è considerato come la principale fonte di ROS

della catena respiratoria.

L' Antimicina A, un inibitore del citocromo b_H , aumenta notevolmente la formazione di ROS da parte del complesso III.

L' Antimicina A inibisce il “Q-cycle”, promuovendo in tal modo l'accumulo di semichinone e la formazione di superossido.

Inoltre, l'inibizione del semichinone diminuisce la formazione mitocondriale di ROS emesso.

Il knockout della proteina Rieske evita la formazione del semichinone nel sito Q_o , impedendo la produzione di ROS.

Quindi, la capacità di generare ROS su entrambi i lati della membrana potrebbe essere attribuito all' accumulo di radicali del semichinone nel sito Q_o .

Inoltre, la produzione di ROS sul lato dello spazio intermembrana spazio della membrana ha dimostrato avere un ruolo fondamentale nella modulazione della via di segnale del fattore ipossia-inducibile.

Mantenimento dei livelli di ROS: il classico sistema difensivo antiossidante

Si stima che circa lo 0,2-2% di O_2 consumato nei mitocondri è ridotto

univalentemente a superossido (O_2^-), il primo e il principale artefice della segnalazione di ROS e del danno.

Successivamente, reagendo con H_2O , il superossido può generare il radicale peridrossile (HO_2), che è coinvolto nei danni ai lipidi e nell'ossidazione delle proteine.

Tuttavia, il superossido viene solitamente convertito in perossido di idrogeno (H_2O_2) dalla manganese-superossido dismutasi o dalla superossido dismutasi rame / zinco (isoenzimi collettivamente indicati come SOD) che si trovano rispettivamente nella matrice mitocondriale e nello spazio intermembrana.

Sebbene sia difficile da misurare, la concentrazione di superossido nella matrice è prevista essere molto bassa a causa dell'elevata concentrazione e della rapida cinetica enzimatica di SOD.

Tuttavia, la formazione di superossido è energeticamente favorevole sempre a causa della bassa concentrazione di superossido e della elevata quantità di O_2 .

Molto rilevante è il fatto che la produzione di superossido da parte della catena respiratoria può aumentare drammaticamente quando il potenziale di membrana mitocondriale è alto (ad esempio, quando la produzione di ATP è bassa).

Pertanto è importante riconoscere che la quantità di ROS rilasciato non è semplicemente una percentuale fissa dell'attività della catena respiratoria (ad esempio, 0,2% del consumo di ossigeno).

Il superossido può anche reagire con radicale ossido nitrico (NO) per generare perossinitrito (ONOO), un lipide-solubile e una specie reattiva dell'azoto (RNS) altamente tossica, che può danneggiare facilmente varie macromolecole biologiche ed induce la morte cellulare.

Diversamente il superossido, H_2O_2 , è più stabile ed è in grado di ossidare i residui tiolici sulle proteine e i reagenti tiolici a basso peso molecolare come il glutathione (GSH).

È stato dimostrato che il H_2O_2 è in grado di spostarsi anche tra le membrane, molto probabilmente con l'aiuto dei trasportatori in quanto il momento di dipolo dell' H_2O_2 è simile a quello dell' H_2O .

Molti studi hanno dimostrato che l' H_2O_2 altera le cascate di vari segnali, dalla chiave di ossidazione dei tioli sulle fosfatasi, alle chinasi, ai fattori di trascrizione e agli enzimi metabolici.

Sebbene sia un concetto ancora da sviluppare, il ruolo putativo di segnalatore dell' H_2O_2 rappresenta un importante legame funzionale tra il metabolismo mitocondriale e i processi di regolazione cellulare.

Sebbene sia evidente il valore di segnalazione del H_2O_2 alla cellula, se esso

viene prodotto in maniera incontrollata può danneggiare la cellula a causa della formazione di radicali idrossilici attraverso le reazioni di Fenton o di Haber-Weiss.

Per questo i vari meccanismi sono messi in piedi per assicurare che i livelli di H_2O_2 siano sotto controllo.

I sistemi perossiredossina (PRx) e GSH/glutaredossina (GRx)/glutathione perossidasi (GPx) sono molto efficienti nell'eliminazione dell' H_2O_2 nei mitocondri e nel cytosol, a causa del loro basso valore della K_m (10 μM per il PRx e 100-200 μM per il GPx) e della loro abbondanza.

Al contrario della perossiredossina (PRx), il sistema GSH/ glutaredossina/ GPx mostra una maggiore pluripotenzialità nella detossificazione perchè rende innocui gli idroperossidi lipidici, le aldeidi prodotte dalla perossidazione dei lipidi (ad esempio il 4-idrossinonenale) e gli xenobiotici elettrofili.

La catalasi, d'altraparte, è spesso impegnata nell'eliminazione dell' H_2O_2 durante l'evidente stress ossidativo a causa del fatto che il valore della K_m è nel range dei millimolari.

La presenza della catalasi nel mitocondrio è fortemente dibattuta perchè sembra essere localizzata principalmente nei perossisomi e in minore quantità nel cytosol.

È stato riportato anche che vari antiossidanti a basso peso molecolare partecipano allo scavenger dell' H_2O_2 .

Gli acidi lipoici e gli α -chetoacidi sono ben conosciuti per le loro capacità di scavengers.

Il sequestro di H_2O_2 porta di conseguenza all'ossidazione e alla successiva inattivazione di molti degli enzimi e delle molecole antiossidanti di difesa.

Per evitare questa trappola, il sistema di difesa antiossidante è ringiovanito dal potere riduttivo immagazzinato nel NADPH.

L'importanza del NADPH è illustrato dalla ridondanza nel numero di enzimi che producono NADPH e dal mantenimento costante di questo nucleotide piridinico nel suo stato ridotto.

Inoltre, il knockout o l'inibizione di enzimi chiave nella produzione di NADPH, quali la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, inducono estrema sensibilità allo stress dell' H_2O_2 .

Enzimi specifici come la glutatione reduttasi e la tioredossina reduttasi effettuano la riduzione e quindi la riattivazione di enzimi di difesa antiossidanti da parte del NADPH. Nel caso di CAT, il NADPH è legato direttamente all'enzima per prevenire l'inattivazione dopo la decomposizione del H_2O_2 .

La ridondanza nel numero di enzimi coinvolti nella detossificazione dai

ROS indica chiaramente la necessità di sistemi di difesa antiossidanti per la sopravvivenza delle cellule.

Questi sistemi di protezione sono, tuttavia, energeticamente costosi.

In primo luogo, i sistemi antiossidanti richiedono ATP per sintetizzare piccole molecole antiossidanti e molecole per il sequestro di ROS dei sottoprodotti di ROS. Un esempio di questo è la biosintesi di GSH e il mantenimento di livelli elevati di SOD.

In secondo luogo, la riattivazione dei sistemi di scavenger di H_2O_2 richiede la potenza riduttiva di NADPH (che richiede energia).

Quindi, può essere prudente per una cella per avere un meccanismo di controllo acuto per diminuire rapidamente i ROS; questo sembra essere soddisfatto dal disaccoppiamento mite del sistema della fosforilazione ossidativa.

Discussione

Il controllo dell'emissione di ROS attraverso il disaccoppiamento

Come accennato in precedenza, basse quantità di ROS sono richieste per supportare diversi sistemi di segnalazione cellulare.

Ad esempio, è stato mostrato che il H_2O_2 genera un aumento dei segnali cellulari generati dai fattori di crescita e dall'insulina.

Ciò si ottiene dalla disattivazione ossidativa delle cisteine catalitiche nei siti attivi delle proteine tirosin-fosfatasi come PTEN.

Quantità fisiologiche di ROS generate dai mitocondri sono documentate migliorare anche la segnalazione dell'insulina.

Tuttavia, le prove indicano anche che il trattamento delle cellule con noti inibitori della catena respiratoria, come l' antimicina A, aumenta notevolmente la produzione mitocondriale di ROS, che porta all'iperossidazione dei vari elementi della via di segnalazione dell'insulina. Per questo, un controllo efficiente dell' emissioni mitocondriale di ROS è fondamentale.

Il mantenimento dell'efficienza del trasporto degli elettroni, con l' O_2 come

accettore terminale di quest'ultimi, è spesso visto come un potenziale meccanismo per il controllo dell'emissione di ROS.

Un meccanismo proposto è quello che avviene mediante il reclutamento delle esochinasi I e II (HK) che catalizzano reazioni che comportano il consumo di ATP e la formazione, quindi, di ADP.

Attraverso il reclutamento delle esochinasi I e II sulla superficie dei mitocondri, una frazione di ATP esportata nel cytosol, dopo la respirazione accoppiata, viene utilizzata immediatamente per la fosforilazione del glucosio, generando ADP nel processo.

Quindi, un flusso costante di ADP, attraverso le esochinasi I e II, è sempre disponibile per far sì che il processo della respirazione accoppiata sia efficiente.

I mitocondri associati alla creatina chinasi (mt-CK) funzionano in modo simile per garantire che l'ADP sia disponibile per la respirazione aerobica.

Di conseguenza, la fornitura di ADP, attraverso le esochinasi I e II e il complesso mitocondrio-creatina chinasi, regola l'emissione mitocondriale di ROS, mantenendo i componenti della catena respiratoria attivi nel trasportare gli elettroni al complesso IV e facendo in modo che la sintesi di ATP sia efficiente. In questo modo, il potenziale mitocondriale di membrana rimane basso.

La perdita inducibile del protone è emersa recentemente come un importante meccanismo per la regolazione del potenziale di membrana per il controllo dell'emissione mitocondriale di ROS.

Con un piccolo disaccoppiamento, i mitocondri possono evitare l'eccesso di equivalenti ridotti nei complessi respiratori e ridurre al minimo la probabilità di interazione degli elettroni con l'ossigeno.

L'adenina nucleotide traslocasi e le UCPs 1-3 contribuiscono ad indurre la perdita di protone.

Tuttavia, ad oggi è stato possibile riscontrare la funzione di catalizzazione della perdita del protone, che diminuisce l'emissione di ROS da parte dei mitocondri, solo per UCP2 e UCP 3.

UCP2 e UCP3, oltre ad UCP1 originariamente scoperta, sono le protetine disaccoppianti più studiate.

Tutte sono membri della famiglia delle proteine trasportatrici di anioni nei mitocondri, che ha circa 40 membri noti.

UCP2 e UCP3 hanno un'omologia di sequenza pari a circa il 59 e il 57% con la proteina disaccoppiante UCP1, localizzata nel tessuto adiposo bruno, ed pari a circa il 70% tra loro.

Mentre è UCP2 è ampiamente espressa in molti tessuti, incluso la milza, il timo, i macrofagi, l'ipotalamo, le cellule beta del pancreas e lo stomaco,

UCP3 è localizzata quasi esclusivamente nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo bruno ed in misura minore nel cuore.

La perdita inducibile del protone attraverso le UCPs implica siano richiesti degli attivatori o degli inibitori per modulare questo processo.

Attraverso diversi esperimenti è stato possibile riscontrare che vari regolatori allosterici come gli acidi grassi, i nucleotidi, e l'acido retinoico, attraverso l'attività delle UCPs1-3, sono in grado di indurre o inibire la perdita protonica.

Tuttavia, in diversi studi e Brand e colleghi hanno fornito le evidenze empiriche che il superossido e i derivati del ROS, vale a dire 4-HNE, attivano la perdita protonica tramite UCPs 1-3.

Infatti, in questo meccanismo, l'iperproduzione di ROS, da parte della catena respiratoria, attiva la perdita protonica attraverso le UCPs, in modo da creare un ciclo a feedback negativo, che regola la produzione di ROS dei mitocondri.

Tuttavia, il ruolo dell'UCP1 nel mitigare la produzione di ROS è molto controverso; l'assenza di UCP1 nei mitocondri del tessuto adiposo bruno, nei topi knockout per UCP1, non ha alcun effetto sulla produzione dei superossidi.

È ben noto che i disaccoppianti chimici, quali il dinitrofenolo e il p-

trifluorometossi-fenilidrazone del carbonil-cianuro, riducono la produzione mitocondriale di H_2O_2 .

Pertanto, l'esistenza di un meccanismo di disaccoppiamento naturale che mitiga direttamente la produzione di ROS da parte della catena respiratoria è profondamente interessante e merita indagini.

Negre-Salvayre et al. per primi hanno suggerito un ruolo per le proteine disaccoppianti nel limitare la produzione mitocondriale di ROS.

In questo caso gli autori hanno trovato che l'inibizione della UCP2 con il GDP ha determinato un forte aumento di H_2O_2 .

Questa prova è stata successivamente supportata dall'osservazione che la sovraespressione di UCP2 diminuisce la produzione di ROS.

Al contrario, nei knockout per UCP2 ($UCP2^{-/-}$) questo si traduce in un aumento concomitante nell'emissione mitocondriale di ROS.

Un'ulteriore prova di supporto viene dall'aumento dell'immunità dei topi knockout per UCP2, contro l'infezione da *Toxoplasma gondii*.

In contrasto con i controlli wild-type, i topi $UCP2^{-/-}$ mostravano un aumento della produzione di ROS nei macrofagi ed un'elevata concentrazione dei markers dello stress ossidativo nel fegato.

Inoltre, UCP2 gioca un ruolo fondamentale nell'acquisizione della farmaco resistenza da parte dei fenotipi tumorali, perché questa proteina protegge

contro le proprietà dei chemioterapici di generare ROS.

Infatti, in uno dei numerosi studi recenti, è stato dimostrato che la sovraespressione di UCP2, nelle cellule tumorali farmaco resistenti, rende i chemioterapici innocui, molto probabilmente attraverso il controllo dei ROS cellulari, attraverso il meccanismo della perdita protonica.

Recentemente, Rial et al., hanno dimostrato che l'inibizione mirata di UCP2, o con la genipina, un prodotto naturale, o con il cromonolo, aumenta notevolmente la sensibilità delle cellule farmaco-resistenti alla chemioterapia.

È stato anche dimostrato che la delezione dell' UCP2 migliora la lesione cerebrale dovuta ad ischemia e ictus ed inoltre è stato anche dimostrato che l'UCP2 è necessaria per la funzionalità della grelina nell'ipotalamo.

Osservazioni simili sono state fatte anche per l'UCP3.

I mitocondri dei topi UCP3^{-/-} producono più ROS e contengono maggiormente il danno ossidativo, rispetto a quelli dei topi wild type.

La produzione di ROS è ridotta in anche nei miotubi L6 trasdotti con vettori adenovirali-UCP3.

Inoltre, la sovraespressione di UCP3 riduce anche l' aumento di formazione di ROS associato con l'invecchiamento.

I livelli delle proteine UCP3 aumentano anche in modo transitorio dopo la

contrazione muscolare per proteggere il muscolo scheletrico dallo stress ossidativo indotto dall' esercizio fisico.

Il knockout dell' UCP3 incrementa la produzione mitocondriale di H_2O_2 e la formazione degli addotti 4-idrossi-2-nonenale sulle proteine dei topi a digiuno.

L' UCP3 protegge anche dall' obesità indotta dalla dieta e dall' insulino-resistenza, due malattie associate a stress ossidativo.

È stato recentemente dimostrato che UCP3 diminuisce la produzione di ROS abbassando il potenziale mitocondriale di membrana.

Tuttavia, se ciò è dovuto alla traslocazione di protoni rimane ancora argomento di dibattito.

Infatti, Lombardi et al. di recente hanno mostrato che UCP3 mitiga lo stress ossidativo grazie alla traslocazione degli idroperossidi lipidici dalla matrice attraverso la degradazione.

Inoltre, Anderson et al. Hanno fornito elementi di prova indicando che UCP3 limita la produzione mitocondriale di ROS aumentando l'efficienza dell' ossidazione degli acidi grassi.

Il controllo dell' emissione di ROS attraverso la perdita protonica non è riservata solo alle cellule dei mammiferi.

Attivazione della perdita protonica attraverso UCPs da parte dei ROS

In diversi studi interessanti, Brand e colleghi hanno fornito la prima evidenza che le UCPs 1-3 sono attivate direttamente dal superossido e dai sottoprodotti di ROS, in particolare dal 4-HNE, per indurre la perdita protonica con la conseguente depolarizzazione della membrana e con la diminuzione della produzione di ROS.

La prova di questa ipotesi è stata ottenuta isolando mitocondri di muscolo scheletrico nei quali era stato esogenamente generato il superossido anche indotto dalla perdita di protoni GDP-sensibile.

Questo conduttanza non è stata osservata in mitocondri UCP3^{-/-}.

Inoltre, il superossido è indotto anche dalla perdita di protone GDP sensibile nei mitocondri del rene e del tessuto adiposo bruno, che esprimono rispettivamente UCP2 e UCP1.

Lo studio del follow-up da parte del gruppo di Brand ha riferito che il superossido generato nella matrice mitocondriale è necessario per attivare la perdita del protone mediata dall'UCP2.

Questa osservazione è supportata utilizzando antiossidanti designati per la matrice come l'ubichinone (mitoQ) e mitoE, che ripuliscono selettivamente i superossidi della matrice.

Inoltre, gli antiossidanti non specifici dei mitocondri erano in grado di prevenire la perdita del protone indotta dal superossido attraverso l' UCP2.

Tuttavia, ci sono molti inconvenienti in questo studio.

Un avvertimento è che gli autori hanno impiegato il sistema xantina/xantina ossidasi che genera il superossido all'esterno dei mitocondri.

Poiché l'energia libera di Gibbs è troppo sfavorevole per far sì che una specie carica come il superossido attraversi il doppio strato lipidico, è improbabile che il superossido generato dalla xantina/xantina ossidasi attivi l' UCP2 della matrice. È anche ipotizzabile che gli antiossidanti non indirizzati alla matrice sarebbero in grado di impedire l' induzione mediata dal superossido dell' UCP2 perché questi ROS sono generati all' esterno dei mitocondri isolati.

Si potrebbe anche sostenere che H_2O_2 potrebbe svolgere questo compito perché può diffondere attraverso le membrane ed ha un' emivita più lunga. Anche SOD genererebbe H_2O_2 piuttosto rapidamente e quest' ultimo è una molecola di segnalazione ben considerata.

Tuttavia, in un altro studio, gli autori hanno concluso che l' H_2O_2 non è responsabile di questa induzione. È anche possibile che il ROS responsabile dell' induzione della perdita protonica è il radicale

peridrossile.

Il radicale peridrossile (HO_2) è abbastanza stabile ad un pH di 7,4 ed è noto che esso dà l' avvio alla perossidazione lipidica. Inoltre, l' HO_2 può anche sfruttare i trasportatori dell' H_2O_2 , come le acquaporine, per il trasporto nella matrice.

Nonostante l'osservazione che il superossido induce la perdita protonica attraverso le proteine UCP, l' esatta natura di questa attivazione biochimica rimane elusiva.

In uno studio pubblicato nel 2003, Echtay e i suoi colleghi hanno fornito dati che indicano che il sottoprodotto dei ROS, chiamato 4-HNE, è richiesto per l'attivazione della perdita protonica attraverso le UCPs 1-3. Queste osservazioni sono state supportate utilizzando vari analoghi strutturali tra i quali il gruppo β -carbonile relativo alla struttura chimica del 4-HNE.

Sulla base di queste osservazioni, è stato proposto che il 4-HNE generato dalla perossidazione lipidica, indotta dal superossido, serve come molecola di segnalazione utilizzata per il feed back e l' attivazione delle UCPs, attenuando così la produzione mitocondriale di ROS.

Queste osservazioni iniziali sono state motivate utilizzando il radicale carbonio-centrato generato dall' AAPH, che catalizza la produzione di 4-

HNE, e lo spin trap fenil-butil-nitrone, che quencia i radicali carbonio-centrati che avviano perossidazione lipidica.

Questa funzione di attivatore della perdita del protone di 4-HNE è stata recentemente confermata usando mitocondri isolati dal muscolo scheletrico.

Tuttavia, nello stesso studio, è stato anche scoperto che ANT è attivato da 4-HNE e dalle sue specie altamente tossiche perchè si suppone che questo enzima sia parte di un poro di transizione della permeabilità mitocondriale.

Può l'aumento osservato nella perdita protonica essere dovuto al parziale collasso del gradiente protonico rispetto alla perdita protonica controllata attraverso UCP3? Un recente lavoro di Brookes e colleghi hanno dimostrato che tale perdita protonica attraverso ANT può essere controllata da una modificazione covalente dei residui di cisteina in questa proteina.

Inoltre, lo stesso gruppo ha dimostrato che la sovrapproduzione di ROS attiva ANT e fa crollare la $\Delta\psi_m$ che porta alla morte cellulare. Il 4-HNE potrebbe essere colpevole per tale attivazione e per l' induzione indiscriminata della perdita di protone. Uno dei principali svantaggi per la funzione di segnalazione putativo da parte del 4-HNE è il fatto che è estremamente tossico ed elettrofilo. Inoltre, per indurre la perdita protonica attraverso le UCPs, sono state adoperate concentrazioni di 4-HNE fino a 50

μM , che è altamente tossica. È molto improbabile che i livelli di 4-HNE salgano a questa concentrazione a meno che la cellula non venga sottoposta ad un grave danno ossidativo (che farebbe anche avviare la cascate dei processi che porta alla morte cellulare). Il 4-HNE è infatti altamente tossico ed è noto che rende numerosi enzimi mitocondriali inattivi attraverso la formazione di addotti con i residui di lisina, di istidina e di cisteina esposti. Recenti scoperte contestano il ruolo ipotizzato per il 4-HNE come un attivatore della perdita protonica mediata dall'UCP. Shabalina et al. ha mostrato che gli effetti del 4-HNE sono indipendenti dall' UCP1. Inoltre, nessun effetto disaccoppiamento del 4-HNE è stato osservato nei mitocondri isolati da topi wild-type o UCP1^{-/-}. Allo stesso modo, è stato anche recentemente osservato che l'esposizione acuta o cronica a 10-40 μM di 4-HNE non induce aumenti nello stadio 4 della respirazione mediato dall' UCP3. Tuttavia, è stato osservato che l' UCP3 era, indirettamente, richiesta per limitare la tossicità del 4-HNE. Quindi, sembra improbabile che la natura selezioni una tale molecola molto reattiva e dannosa come messaggero secondario. Sembrerebbe, tuttavia, più probabile che il messaggero sia ROS, sal momento che i suoi livelli sono più facili da controllare.

La glutathionilazione reversibile e le proteine disaccoppianti

E' emerso che la S-glutathionilazione reversibile degli enzimi mitocondriali è un importante meccanismo della regolazione del metabolismo in risposta ai cambiamenti nell'ambiente redox e alla produzione di ROS.

L'ambiente della matrice mitocondriale ospita un ambiente favorevole per la regolazione della glutathionilazione delle proteine.

Questo avviene a causa della concentrazione estremamente elevata (fino a 10 mM) del GSH nella matrice e all' elevata concentrazione dei residui tiolici esposti.

La capacità di un residuo tiolico a reagire con il GSH dipende da quanto esso è esposto nell'ambiente acquoso della matrice e dalla reattività del tiolo stesso.

Il pKa di un tipico residuo tiolico cistenilico è circa 8,3; tuttavia, alcuni tioli hanno una pKa minore a causa della carica dell' ambiente in cui si trovano.

In aggiunta, il pH della matrice è basico (pH ~ 8). Quindi, l'ambiente della matrice ambiente fornisce la condizione necessaria per promuovere la modifica del residuo tiolico da parte del GSH.

I ROS sembrano essere gli attivatori più accreditati per questo processo.

Numerosi studi hanno dimostrato che la combinazione di una quantità millimolare di GSH e di H_2O_2 può indurre la glutathionilazione di diverse proteine.

Al contrario, il glutathione ossidato (GSSG) è un agente povero di glutathionilazione nei mitocondri perché le concentrazioni sono sempre molto basse ed è difficile indurre glutathionilazione in vitro anche con elevate quantità di GSSG e di proteine ricche di tioli.

Tuttavia, se il GSSG sia coinvolto nella glutathionilazione tramite una semplice reazione di scambio tiolo-disolfuro è un argomento ancora fortemente dibattuto.

È stato suggerito che glutathionilazione della proteine agisce come meccanismo protettivo per impedire l'ossidazione/inattivazione delle proteine e serve anche come un regolatore negativo della produzione di ROS da parte del complesso I.

Ad esempio, è stato recentemente scoperto che il complesso I è glutathionilato su specifici residui di cisteina nelle subunità 51 e 75-kDa subunità, e che questo diminuisce la produzione di ROS da parte sua.

La glutathionilazione svolge anche un ruolo protettivo dopo lo stress ossidativo o dopo una presupposta ischemia perché protegge dal danno ossidativo le cisteine esposte.

Un esempio di questo è la protezione dell' α -chetoglutarato deidrogenasi mediante glutathionilazione.

Infatti, durante lo stress ossidativo, i tioli catalitici dell' α -chetoglutarato deidrogenasi possono essere disattivati dall' ossidazione irreversibile dei residui di tiolici dell' acido sulfinico (SO_2H) o dell'acido sulfonico (SO_3H).

Quindi, attraverso la modifica critica reversibile dei tioli, la glutathionilazione può proteggere gli enzimi nei mitocondri durante lo stress ossidativo.

La glutathionilazione delle proteine non è sempre direttamente catalizzata dai ROS; infatti, ora viene accettato che sia il GSH a coniugare gli eventi attraverso vari enzimi.

Inoltre, recenti studi hanno evidenziato che diverse proteine sono deglutathionilate dai ROS, dimostrando che queste proteine sono controllate mediante coniugazione al glutathione.

Per esempio, in condizioni cellulari normali l' actina monomerica è mantenuta in uno stato di glutathionilazione per impedire polimerizzazioni inutili.

Tuttavia, dopo la stimolazione delle cellule da parte dei fattori di crescita cellulari che aumentano i livelli di ROS, l' actina diventa deglutathionilata, e questo porta alla sua successiva polimerizzazione.

La succinato deidrogenasi è anche deglutationilata dall'aumento dei ROS.

Alcuni degli enzimi coinvolti nella glutathionilazione / deglutathionilazione includono il GRx (isoenzimi 1 e 2), la glutathione S-transferasi, e, in misura minore, la tioredossina.

Al contrario, meno si sa circa la glutathionilazione.

Quindi, la glutathionilazione non è indotta soltanto dal palese stress ossidativo ma piuttosto un sistema altamente complesso di proteine regolato in modo simile alla fosforilazione.

Tuttavia, rispetto alla fosforilazione, la nostra comprensione della glutathionilazione reversibile e il suo ruolo nel controllo delle proteine è ancora agli albori. Quindi, per quanto riguarda le reazioni della glutathionilazione/deglutathionilazione abbiamo ancora molto da capire.

Recentemente è stato dimostrato che la glutathionilazione/deglutathionilazione svolge un ruolo chiave nel controllo della perdita protonica, indotta dai ROS, attraverso le UCPs 2 e 3, ma curiosamente non attraverso UCP1.

Tutti e tre queste UCPs contengono un numero di residui di cisteina localizzati nelle predette regioni chiave della membrana e in una regione di loop che viene a contatto con la matrice.

Utilizzando una diammina come catalizzatore, è stato scoperto che la

glutathionilazione diminuisce la perdita del protone mediata da UCP3.

La glutathionilazione di UCP3 potrebbe essere enzimaticamente guidata; anzi, il GRx1 coniugato covalentemente al GSH, in vitro, è purificato dall' UCP3.

È stato, inoltre, osservato che i ROS (in particolare H_2O_2) non deglutathionilato sono purificati, in vitro, dall' UCP3. Questo suggerisce che potrebbe essere necessario un enzima sensibile ai ROS per rimuovere il GSH.

La diammidè viene comunemente utilizzata per l'attivazione chimica della glutathionilazione proteina. La glutathionilazione diminuisce la perdita di protoni dipendente dal consumo di ossigeno nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico dei topi wild-type, ma non in quelli UCP3^{-/-}.

Curiosamente, lo stesso andamento è stato osservato nel tessuto grasso bruno, indicando che la tanto più abbondante UCP1 non potrebbe compensare l'assenza di UCP3 e quindi non è regolata dalla glutathionilazione.

In uno studio molto recente, Hirasaka et al. hanno identificato un' interazione modulatoria riducente tra l' UCP3 e la tioredossina.

Questi risultati, insieme con agli altri sul coinvolgimento dell' UCP1 nella protezione dai ROS, sono coerenti con la conclusione generale che UCP1 e

UCP3 hanno funzioni divergenti.

Queste osservazioni in vitro sono state confermate in situ utilizzando cellule di muscolo primario di topi wild-type e UCP3^{-/-} - topi e l'analizzatore di flusso extracellulare Seahorse.

Il trattamento di miotubi wild-type con diammide risulta diminuito in quattro stati della respirazione.

Questa risposta era assente nei miotubi UCP3^{-/-}.

Inoltre, l'esaurimento del GSH cellulare con sulfoximine butionine (BSO) smorzava l'inibizione della UCP3 indotta dalla diammide, fornendo ulteriori prove che la glutathionilazione inibisce la perdita protonica mediata dall'UCP3.

Inoltre, l'esaurimento del cellulare GSH con butionina sulfoximina (BSO) smorzava l'diammide-indotta inibizione della UCP3, fornendo ulteriori prove che glutathionilazione inibisce UCP3-mediata perdita protonica.

È importante notare che la butionina sulfoximina (BSO) o l'esposizione acuta a diammide non ha influenzato la respirazione basale sia nelle cellule primarie wild-type, sia in quelle UCP3^{-/-}.

Quando è stato sondato il ruolo di ROS nell'attivazione di perdita protonica attraverso UCP3 è stato osservato che basse dosi di ROS aumenta la stadio 4 della respirazione nei miotubi primari wild-type, ma non in

quelli UCP3^{-/-}.

Dosi più elevate di ROS non erano in grado di indurre perdita protonica. Ciò indica che soltanto piccole quantità di ROS sono in grado di attivare UCP3. Coerentemente con i risultati precedenti, il trattamento con diammidato ha attenuato l'aumento ROS-indotto del quarto stadio della respirazione, una risposta che era assente nelle cellule primarie UCP3^{-/-}.

Viceversa, il trattamento acuto dei mitotubi primari con quantità di H₂O₂ è stato in grado di invertire la glutathionilazione reversibile delle proteine, indicando che UCP3 è controllata dinamicamente da ROS e dal GSH. Osservazioni simili sono state fatte per quanto riguarda l'UCP2.

Preparazioni di timociti primari da topi wild-type mostrano una diminuzione del quarto stadio della respirazione, dopo il trattamento con diammidato.

Queste osservazioni mancano nei timociti UCP2^{-/-}. Pertanto, questi risultati sono in linea con la conclusione che i ROS inducono lo "switch on/off" della deglutathionilazione/glutathionilazione rispettivamente per la perdita protonica mediata da UCP2 e UCP3.

Queste nuove osservazioni forniscono le basi meccanicistiche per i risultati iniziali di altri per i quali i ROS attivano la perdita protonica attraverso UCP2 e UCP3. A differenza delle precedenti osservazioni, non abbiamo

trovato alcuna prova che UCP1 è controllata dalla glutathionilazione.

Così UCP1 sembra avere divergenti funzioni fisiologiche rispetto ad UCP2 e UCP3.

La funzione fisiologica di UCP1 sembra essere riservata alla termogenesi, mentre quella di UCP2 e UCP3 consiste nel mantenere i livelli di ROS entro limiti tollerabili. E' molto probabile che UCP2 e UCP3 svolgano funzioni di segnalazione attraverso la modulazione dei livelli di ROS, anzi, l'UCP2 ipotalamica sembra necessaria per segnalare la risposta alla fame della grelina.

Sebbene sia stato scoperto che Grx1 era in grado di glutathionilare UCP3, gli enzimi impiegati in vivo, inclusi quelli necessari per la rimozione mediata dai ROS, non sono ancora noti.

E' possibile che sia il GRx2 nella matrice mitocondriale ad essere responsabile della glutathionilazione dell' UCP2 e dell' UCP3. Di conseguenza, le reazioni di glutathionilazione dell' UCP sono regolate, più probabilmente, in maniera simile a quella della F-actina o della succinato deidrogenasi.

Un recente studio ha dimostrato che le funzioni del GSH e dell' UCP2 sono interconnesse. Sulla base delle osservazioni meccanicistiche, si può ipotizzare che i ROS e il GSH controllano la perdita del protone attraverso

UCP2 e UCP3, in risposta alle variazioni della produzione mitocondriale di ROS e al potenziale di membrana. Quando i livelli di ROS sono normali, il GSH è in abbondanza e il disaccoppiamento non è necessario per mantenere il potenziale di membrana

Tuttavia, i piccoli aumenti di ROS possono indurre il rilascio del GSH da UCPs 2 e 3 nel tentativo di preservare un ambiente riducente e correggere il potenziale di membrana mitocondriale.

Conclusioni

Nonostante l'identificazione di UCP2 e UCP3 nel 1997, esistono poche informazioni sui dettagli meccanicistici riguardo la loro funzione biochimica.

Gli studi hanno individuato una vasta varietà di ruoli per queste proteine incluso la conduttanza dei protoni, il trasporto e il metabolismo degli acidi grassi, l'efflusso mitocondriale dei sottoprodotti di ROS, il metabolismo del glucosio e l'omeostasi del calcio. Alla luce delle osservazioni fatte sin ora, una funzione di queste due proteine disaccoppianti potrebbe essere quella di un loro coinvolgimento nel controllo della produzione mitocondriale di ROS.

I recenti risultati sono coerenti con la conclusione che UCP2 e UCP3 funzionano come "prima linea di difesa" contro la produzione mitocondriale di ROS. Infatti, in condizioni metaboliche che richiedono la sintesi di ATP, la perdita di protoni indotta attraverso le UCPs non è necessaria per mantenere le emissioni dei ROS entro limiti tollerabili.

Un leggero aumento della produzione mitocondriale di ROS potrebbe indurre la deglutazione di UCPs 2 e 3 e quindi la loro attività, che successivamente sarebbe quella di diminuire la produzione di ROS.

Interessanti studi hanno dimostrato che la produzione mitocondriale di superossido è ciclica, con una periodicità di circa 20 s in condizioni cellulari normali.

I flash del superossido nei mitocondri sono apparentemente auto-regolati; è molto probabile che ciò avvenga attraverso l'attività di UCP2 e UCP3. Infatti, anche il gradiente elettrochimico ($\Delta\psi_m$) aumenta e diminuisce insieme a ROS e NADH, in maniera periodica, con un periodo al di sopra di 40 s in condizioni metaboliche basali.

In questo UCP2 e UCP3 sono probabilmente attivate e disattivate in risposta alla naturale periodicità del metabolismo mitocondriale. Durante i periodi prolungati di elevata produzione di ROS è anche probabile che UCPs 2 e 3 sono disattivate attraverso la glutationilazione per evitare il collasso completo del potenziale della membrana mitocondriale e l'induzione della morte cellulare mentre la cellula coinvolge la potenza dell'arsenale antiossidante.

Grazie a queste recenti scoperte sul controllo molecolare delle proteine disaccoppianti, si spera si possano avere progressi più rapidi nella spiegazione del loro controllo, in modo da arrivare ad utili approcci terapeutici per le diverse malattie nelle quali le UCPs sono implicate.

BIBLIOGRAFIA

Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552:335–344; 2003.

Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483–495; 2005.

Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527–605; 1979.

Patten, D. A.; Germain, M.; Kelly, M. A.; Slack, R. S. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* 20 (Suppl. 2):S357–S367; 2010.

Ando, K.; Fujita, T. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 47:213–218; 2009.

Chan, C. B.; Harper, M. E. Uncoupling proteins: role in insulin resistance and insulin insufficiency. *Curr. Diabetes Rev.* 2:271–283; 2006.

Harper, M. E.; Bevilacqua, L.; Hagopian, K.; Weindruch, R.; Ramsey, J. J. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol. Scand.* 182: 321–331; 2004.

Korshunov, S. S.; Skulachev, V. P.; Starkov, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416:15–18; 1997.

Starkov, A. A.; Fiskum, G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.* 86:1101–1107; 2003.

Brand, M. D.; Esteves, T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2:85–93; 2005.

Brand, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 35:811–820; 2000.

Rolfe, D. F.; Newman, J. M.; Buckingham, J. A.; Clark, M. G.; Brand, M. D. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am. J. Physiol.* 276:C692–C699; 1999.

Harper, M. E.; Green, K.; Brand, M. D. The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 28:13–33; 2008.

Rolfe, D. F.; Brand, M. D. Proton leak and control of oxidative phosphorylation in perfused, resting rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1276:45–50; 1996.

Arvier, M.; Lagoutte, L.; Johnson, G.; Dumas, J. F.; Sion, B.; Grizard, G.; Malthiery, Y.; Simard, G.; Ritz, P. Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E1320–E1324; 2007.

Bezaire, V.; Seifert, E. L.; Harper, M. E. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J.* 21:312–324; 2007.

Guzman, J. N.; Sanchez-Padilla, J.; Wokosin, D.; Kondapalli, J.; Ilijic, E.; Schumacker, P. T.; Surmeier, D. J. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468:696–700; 2010.

Sluse, F. E.; Jarmuszkiewicz, W.; Navet, R.; Douette, P.; Mathy, G.; Sluse-Goffart, C. M. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim. Biophys. Acta* 1757:480–485; 2006.

Echtay, K. S.; Roussel, D.; St-Pierre, J.; Jekabsons, M. B.; Cadenas, S.; Stuart, J. A.; Harper, J. A.; Roebuck, S. J.; Morrison, A.; Pickering, S.; Clapham, J. C.; Brand, M. D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415:96–99; 2002.

Echtay, K. S.; Esteves, T. C.; Pakay, J. L.; Jekabsons, M. B.; Lambert, A. J.; Portero- Otin, M.; Pamplona, R.; Vidal-Puig, A. J.; Wang, S.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22:4103–4110; 2003.

Aguirre, E.; Cadenas, S. GDP and carboxyatractylate inhibit 4-hydroxynonenal-activated proton conductance to differing degrees in mitochondria from skeletal muscle and heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1797:1716–1726; 2010.

DeBerardinis, R. J.; Lum, J. J.; Hatzivassiliou, G.; Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7:11–20; 2008.

Adam-Vizi, V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal.* 7:1140–1149; 2005.

Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1–13; 2009.

Dzbek, J.; Korzeniewski, B. Control over the contribution of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) and proton gradient (ΔpH) to the protonmotive force ($\Delta\mu$): in silico studies. *J. Biol. Chem.* 283:33232–33239; 2008.

Pryor, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48:657–667; 1986.

Tretter, L.; Adam-Vizi, V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J. Neurosci.* 24:7771–7778; 2004.

Tretter, L.; Takacs, K.; Hegedus, V.; Adam-Vizi, V. Characteristics of alphasglycerophosphate- evoked H_2O_2 generation in brain mitochondria. *J. Neurochem.* 100:650–663; 2007.

St-Pierre, J.; Buckingham, J. A.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277:44784–44790; 2002.

Richard, D.; Collins, S.; Ricquier, D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26:435–439; 2000.

Mailloux, R. J.; Adjeitey, C. N.; Harper, M. E. Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents. *PLoS One* 5:e13289; 2010.

Derdak, Z.; Mark, N. M.; Beldi, G.; Robson, S. C.; Wands, J. R.; Baffy, G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res.* 68:2813–2819; 2008.

Baffy, G. Uncoupling protein-2 and cancer. *Mitochondrion* 10:243–252; 2010.

Rial, E.; Rodriguez-Sanchez, L.; Aller, P.; Guisado, A.; Mar Gonzalez-Barroso, M.; Gallardo-Vara, E.; Redondo-Horcajo, M.; Castellanos, E.; Fernandez de la Pradilla, R.; Viso, A. Development of chromanes as novel inhibitors of the uncoupling proteins. *Chem. Biol.* 18:264–274; 2011.

Mehta, S. L.; Li, P. A. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29:1069–1078; 2009.

Andrews, Z. B.; Liu, Z. W.; Walllingford, N.; Erion, D. M.; Borok, E.; Friedman, J. M.; Tschop, M. H.; Shanabrough, M.; Cline, G.; Shulman, G. I.; Coppola, A.; Gao, X. B.; Horvath, T. L.; Diano, S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454:846–851; 2008.

Vidal-Puig, A. J.; Grujic, D.; Zhang, C. Y.; Hagen, T.; Boss, O.; Ido, Y.; Szczepanik, A.; Wade, J.; Mootha, V.; Cortright, R.; Muoio, D. M.; Lowell, B. B. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275:16258–16266; 2000.

Seifert, E. L.; Bezaire, V.; Estey, C.; Harper, M. E. Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J. Biol. Chem.* 283:25124–25131; 2008.

Nabben, M.; Hoeks, J.; Briede, J. J.; Glatz, J. F.; Moonen-Kornips, E.; Hesselink, M. K.; Schrauwen, P. The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Lett.* 582: 4147–4152; 2008.

Jiang, N.; Zhang, G.; Bo, H.; Qu, J.; Ma, G.; Cao, D.; Wen, L.; Liu, S.; Ji, L. L.; Zhang, Y. Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic. Biol. Med.* 46:138–145; 2009.

Choi, C. S.; Fillmore, J. J.; Kim, J. K.; Liu, Z. X.; Kim, S.; Collier, E. F.; Kulkarni, A.; Distefano, A.; Hwang, Y. J.; Kahn, M.; Chen, Y.; Yu, C.; Moore, I. K.; Reznick, R. M.; Higashimori, T.; Shulman, G. I. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117:1995–2003; 2007.

Costford, S. R.; Chaudhry, S. N.; Salkhordeh, M.; Harper, M. E. Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E1304–E1312; 2006.

Lombardi, A.; Busiello, R. A.; Napolitano, L.; Cioffi, F.; Moreno, M.; de Lange, P.; Silvestri, E.; Lanni, A.; Goglia, F. UCP3 translocates lipid hydroperoxide and mediates lipid hydroperoxide-dependent mitochondrial uncoupling. *J. Biol. Chem.* 285:16599–16605; 2010.

Anderson, E. J.; Yamazaki, H.; Neuffer, P. D. Induction of endogenous uncoupling protein 3 suppresses mitochondrial oxidant emission during fatty acid-supported respiration. *J. Biol. Chem.* 282:31257–31266; 2007.

Rey, B.; Roussel, D.; Romestaing, C.; Belouze, M.; Rouanet, J. L.; Desplanches, D.; Sibille, B.; Servais, S.; Duchamp, C. Up-regulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria. *BMC Physiol.* 10:5; 2010.

Smith, A. M.; Ratcliffe, R. G.; Sweetlove, L. J. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J. Biol. Chem.* 279:51944–51952; 2004.

Jastroch, M.; Wuertz, S.; Kloas, W.; Klingenspor, M. Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol. Genomics* 22:150–156; 2005.

Jastroch, M.; Buckingham, J. A.; Helwig, M.; Klingenspor, M.; Brand, M. D. Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain. *J. Comp. Physiol. B* 177:743–752; 2007.

Echtay, K. S.; Murphy, M. P.; Smith, R. A.; Talbot, D. A.; Brand, M. D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side: studies using targeted antioxidants. *J. Biol. Chem.* 277:47129–47135; 2002.

Murphy, M. P.; Echtay, K. S.; Blaikie, F. H.; Asin-Cayuela, J.; Cocheme, H. M.; Green, K.; Buckingham, J. A.; Taylor, E. R.; Hurrell, F.; Hughes, G.; Miwa, S.; Cooper, C. E.; Svistunenko, D. A.; Smith, R. A.; Brand, M. D. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J. Biol. Chem.* 278: 48534–48545; 2003.

Echtay, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 43:1351–1371; 2007.

Aguirre, E.; Cadenas, S. GDP and carboxyatractylate inhibit 4-hydroxynonenal-activated proton conductance to differing degrees in mitochondria from skeletal muscle and heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1797:1716–1726; 2010.

Li, Q.; Sato, E. F.; Kira, Y.; Nishikawa, M.; Utsumi, K.; Inoue, M. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 40:173–181; 2006.

Nadtochiy, S. M.; Tompkins, A. J.; Brookes, P. S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem. J.* 395: 611–618; 2006.

Ruef, J.; Moser, M.; Bode, C.; Kubler, W.; Runge, M. S. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. *Basic Res. Cardiol.* 96:143–150; 2001.

Ji, C.; Amarnath, V.; Pietenpol, J. A.; Marnett, L. J. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem. Res. Toxicol.* 14:1090–1096; 2001.

Choksi, K. B.; Boylston, W. H.; Rabek, J. P.; Widger, W. R.; Papaconstantinou, J. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1688:95–101; 2004.

Humphries, K. M.; Szweda, L. I. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4- hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37:15835–15841; 1998.

Shabalina, I. G.; Petrovic, N.; Kramarova, T. V.; Hoeks, J.; Cannon, B.; Nedergaard, J. UCP1 and defense against oxidative stress: 4-hydroxy-2-nonenal effects on brown fat mitochondria are uncoupling protein 1-independent. *J. Biol. Chem.* 281:13882–13893; 2006.

Mailloux, R. J.; Seifert, E. L.; Bouillaud, F.; Aguer, C.; Collins, S.; Harper, M. E. Glutathionylation acts as a control switch for uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J. Biol. Chem.* 286:21865–21875; 2011.

Hurd, T. R.; Costa, N. J.; Dahm, C. C.; Beer, S. M.; Brown, S. E.; Filipovska, A.; Murphy, M. P. Glutathionylation of mitochondrial proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 7:999–1010; 2005.

Meredith, M. J.; Reed, D. J. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 257:3747–3753; 1982.

Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Milzani, A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 43:883–898; 2007.

Hill, B. G.; Bhatnagar, A. Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function. *IUBMB Life* 59:21–26; 2007.

Rhee, S. G.; Bae, Y. S.; Lee, S. R.; Kwon, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE* 2000:pe1; 2000.

Gallogly, M. M.; Mieyal, J. J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7:381–391; 2007.

Hurd, T. R.; Requejo, R.; Filipovska, A.; Brown, S.; Prime, T. A.; Robinson, A. J.; Fearnley, I. M.; Murphy, M. P. Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of CYS residues in decreasing oxidative damage. *J. Biol. Chem.*

283: 24801–24815; 2008.

Applegate, M. A.; Humphries, K. M.; Szweda, L. I. Reversible inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: glutathionylation and protection of lipoic acid. *Biochemistry* 47:473–478; 2008.

Nulton-Persson, A. C.; Starke, D.W.; Mieyal, J. J.; Szweda, L. I. Reversible inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase in response to alterations in the mitochondrial glutathione status. *Biochemistry* 42:4235–4242; 2003.

Mieyal, J. J.; Gallogly, M. M.; Qanungo, S.; Sabens, E. A.; Shelton, M. D. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* 10:1941–1988; 2008.

Chen, Y. R.; Chen, C. L.; Pfeiffer, D. R.; Zweier, J. L. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 282:32640–32654; 2007.

Wang, J.; Boja, E. S.; Tan, W.; Tekle, E.; Fales, H. M.; English, S.; Mieyal, J. J.; Chock, P. B. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 276:47763–47766; 2001.

K. Hirasaka, C.U. Lago, M.A. Kenaston, K. Fathe, S.M. Nowinski, T. Nikawa, E.M. Mills, Identification of a redox-modulatory interaction between uncoupling protein 3 and thioredoxin 2 in the mitochondrial intermembrane space, *Antioxid. Redox Signal.* (in press).

De Bilbao, F.; Arsenijevic, D.; Vallet, P.; Hjelle, O. P.; Ottersen, O. P.; Bouras, C.; Raffin, Y.; Abou, K.; Langhans, W.; Collins, S.;

Plamondon, J.; Alves-Guerra, M. C.; Haguenaue, A.; Garcia, I.; Richard, D.; Ricquier, D.; Giannakopoulos, P. Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels. *J. Neurochem.* 89: 1283–1292; 2004.

Pi, J.; Bai, Y.; Daniel, K. W.; Liu, D.; Lyght, O.; Edelstein, D.; Brownlee, M.; Corkey, B. E.; Collins, S. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* 150: 3040–3048; 2009.

Wang, W.; Fang, H.; Groom, L.; Cheng, A.; Zhang, W.; Liu, J.; Wang, X.; Li, K.; Han, P.; Zheng, M.; Yin, J.; Wang, W.; Mattson, M. P.; Kao, J. P.; Lakatta, E. G.; Sheu, S. S.; Ouyang, K.; Chen, J.; Dirksen, R. T.; Cheng, H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134:279–290; 2008.

Aon, M. A.; Cortassa, S.; Marban, E.; O'Rourke, B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 278:44735–44744; 2003.